

JP5271299

Publication Title:

No title available

Abstract:

Abstract of JP5271299

PURPOSE:To obtain the subject adsorbent favorably maintaining specific adsorption power to antibody (immunoglobulin), thus capable of efficiently separating and purifying antibody, by reaction of an acid anhydride group-bearing compound with fiber surface followed by reaction and immobilization of protein A. **CONSTITUTION:**Fibers such as nylon 6 is immersed in 3N HCl at 30 deg.C for 30min to hydrolyze part thereof and induce free amino group on the fiber surface followed by thoroughly washing with distilled water and then drying. The resulting fibers is then immersed in an acetone solution of an acid anhydride group-bearing compound such as 2% (W/V) maleic anhydride-methyl vinyl ether copolymer at room temperature for one hour and washed with acetone and then dried in a vacuum. The resultant fibers is immersed in a protein A-contg. 10mM acetic acid buffer solution (pH4.0) at room temperature for 2hr to immobilize the protein A on the fiber surface, thus obtaining the objective protein A-immobilized adsorbent having the above-mentioned advantages. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-271299

(43) 公開日 平成5年(1993)10月19日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 17/08		7731-4H		
// A 6 1 K 39/44		8413-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平4-97382	(71) 出願人	000004503 ユニチカ株式会社 兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地
(22) 出願日	平成4年(1992)3月25日	(72) 発明者	戴下 安紀 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内
		(72) 発明者	小池 紀夫 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内
		(72) 発明者	岡田 圭史 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内
		(74) 代理人	弁理士 大島 道男

(54) 【発明の名称】 プロテインA固定化吸着体

(57) 【要約】

【目的】 プロテインA特有の抗体（免疫グロブリン）との特異的吸着性を良好に保持しており、極めて効率的に分離、精製することができるプロテインA固定化吸着体を提供する。

【構成】 繊維表面に酸無水物基を有する化合物を反応させ、プロテインAを固定化したことを特徴とする。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 繊維表面に酸無水物基を有する化合物を反応させ、プロテインAを固定化したことを特徴とするプロテインA固定化吸着体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、繊維表面にプロテインAを固定化し、抗体の効率的な分離、精製に用いられるプロテインA固定化吸着体に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来より、ポリエステル、ポリアミド、ポリアクリロニトリルなどの繊維を用いて抗体等の生理活性物質を吸着させて、分離、精製することが提案されている（特公昭48-23891号公報等参照）。このような吸着に使用する吸着体に要求される性能としては、抗体等の目的物質に対する特異的吸着性が大きいこと、単位重量あたりの吸着容量が大きいこと、分離、精製操作を行う際、十分な機械的強度と安定性を有することなどがあげられる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、従来の吸着体においては、これらの性能を十分に満足させるものが得られていない。特に、単位重量あたりの吸着容量が小さいので、吸着に要する装置が大型化するため、効率的ではなく経済的に不利であった。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、この点にかんがみ、単位重量あたりの吸着容量の大きい抗体特異的吸着体を開発すべくプロテインA固定化吸着体について種々検討した結果、本発明に到達したものである。

【0005】 すなわち、本発明におけるプロテインA固定化吸着体は、繊維表面に酸無水物基を有する化合物を反応させ、プロテインAを固定化したことを特徴とするものである。

【0006】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明に使用する繊維としては、ナイロン4、ナイロン6、ナイロン12などのポリアミド、ポリウレタンなどの繊維のほか、ポリエチレンテレフタレートなどのポリエステル、ポリアクリロニトリル、ポリビニルアルコール、再生セルロース等の繊維を使用することができる。また、これらの繊維は共重合体からなるものでもよい。単糸繊維は10~0.001デニールが好ましく、特に好ましくは4~0.001デニールである。また、繊維は、紡績糸、わた、不織布、紙、織物、編物などの各種形状の繊維集合体として使用することができる。

【0007】 本発明に使用する酸無水物基を有する化合物としては、例えば無水マレイン酸メチルビニルエーテル共重合体、無水マレイン酸エチレン共重合体、無水マレイン酸スチレン共重合体などのポリカルボン酸無水物、無水マレイン酸、無水フタル酸などがあげられる。

2

【0008】 本発明に使用するプロテインAは、細菌細胞壁に存在する分子量が約42,000のタンパク質であって、免疫グロブリンと特異的に結合するものである。

【0009】 本発明のプロテインA固定化吸着体は、繊維表面上に酸無水物基を有する化合物を反応させて、酸無水物基を導入し、次いでプロテインAを反応させて上記酸無水物基とプロテインAのアミノ基とを結合させて固定化することにより得られる。

10 【0010】 本発明において、酸無水物基と反応しうる反応基を有する繊維、例えばアミノ基等がある繊維の場合は、酸無水物基を有する化合物を繊維表面に直接反応させることができる。酸無水物基と反応しうる反応基を有しない場合には、まず、エチレンジアミン、トリメチレンジアミン、テトラメチレンジアミンなどのアミンや、エチレンイミンなどのイミンを、グルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアナートなどの2官能性試薬あるいは、シクロヘキシルモルホリノエチルカルボジイミドメトトルエンスルホン酸、ジシクロヘキシルカルボジイミドなどの縮合剤などによりアミノ基を導入したのち、酸無水物基を有する化合物を繊維表面に反応させることができる。また、繊維表面上に無水マレイン酸を γ 線や電子線によりグラフト重合させ、酸無水物を反応させることができる。酸無水物基を有する化合物を反応させた繊維は、繊維表面に活性の酸無水物基を有するので、プロテインAの有するアミノ基との間に温和な条件で容易に結合が生じ、共有結合により固定化することができる。プロテインA固定化処理は、プロテインAを水あるいは生理食塩水に溶解した溶液に酸無水物基を有する化合物を反応させた繊維を加えて、常温で数時間攪拌することにより達成できる。プロテインAの溶液中に酸、塩基、塩などを添加してもよい。

【0011】

【作用】 本発明においては、繊維表面に酸無水物基を有する化合物を反応させて繊維上に活性な酸無水物基を導入し、次いでこれにプロテインAを反応させることにより、プロテインAの活性を低下させることなく繊維上に固定することができる。このプロテインAは優れた活性を保持しているため、プロテインA特有の抗体（免疫グロブリン）との特異的吸着性を良好に保持しており、この吸着性を利用して抗体を効率的に分離、精製することができる。

【0012】

【実施例】 以下、実施例によって本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1

ナイロン6からなる繊維（1デニール）を3N塩酸中に30℃、30分間浸漬した後、蒸留水にて洗浄した。洗浄、乾燥後、2%（w/v）無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体の脱水アセトン溶液中に室温で1時間

3

浸漬し、アセトンにて洗浄後、真空乾燥した。得られた繊維をプロテインA (SIGMA社製)を含む10mM酢酸(pH4.0)緩衝液中に室温で2時間浸漬することによりプロテインAの固定化を行った。

【0013】このようにして得られたプロテインA固定化ナイロン繊維1gをカラム(0.5×15cm)に詰め、0.9%塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.2,以下PBS緩衝液と略す。)に0.1%(w/v)アジ化ナトリウムを加えた溶液で平衡化し、その後の反応に用いた。

【0014】ウサギ血液より得られる血清を等量のPBS緩衝液で希釈したものを試料とした。この試料を流速1ml/3minでプロテインA固定化ナイロン繊維充填カラムに通し、通過液を分取した。さらに、280nmでの吸光度測定により通過液中のタンパク質の有無を確認しながら、この波長でのタンパク質の吸収がなくなるまでPBS緩衝液を通過させた。次いで、100mMクエン酸緩衝液(pH4.0)でカラムに吸着したIgG(免疫グロブリンG)を溶出し、溶出液に直ちに1MのPBS緩衝液を加えた。

【0015】このようにして得られた、カラムの通過液の画分とカラムに吸着した画分をそれぞれSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法(Laemmli 1970)を用いることにより含まれるタンパク質を同定した。その結果、プロテインA固定化ナイロン繊維カラムに吸着した画分には分子量15万付近にIgGに相当する単一のバンドが確認され、一方通過液画分には他の血漿タンパクが確認されたが、IgGに相当する位置にバンドは検出されず、IgGが良好にプロテインA固定化ナイロン繊維カラムに吸着したことが分かった。

【0016】実施例2

ポリエチレンテレフタレートからなる繊維(1デニール)を1N水酸化ナトリウム中に70℃、1時間浸漬し、蒸留水にて洗浄後、0.1N塩酸中に70℃、1時間浸漬処理した。蒸留水にて洗浄、乾燥後、10%(w/v)のポリエチレンジオキシメチレン水溶液とメタノールとの1:5混合液に室温で30分間浸漬し、5%(w/v)ジシクロヘキシルカルボジイミドのメタノール溶液を加え、引き続き室温で2時間浸漬した。メタノールにて洗浄、乾燥後、2%(w/v)無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体の脱水アセトン溶液中に室温で1時間浸漬し、アセトンにて洗浄後、真空乾燥した。得られた繊維をプロテインA (SIGMA社製)を含む10mM酢酸(pH4.0)緩衝液中に室温で2時間浸漬することによりプロテインAの固定化を行った。

【0017】このようにして得られたプロテインA固定化ポリエステル繊維1gをカラム(0.5×15cm)に詰め、0.9%塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.2)に0.1%(w/v)アジ化ナトリウムを加えた溶液で平衡化し、その後の反応に用いた。

4

【0018】ウサギ血液より得られる血清を等量のPBS緩衝液で希釈したものを試料とした。この試料を流速1ml/3minでプロテインA固定化ポリエステル繊維カラムに通過させ、通過液を分取した。さらに、280nmでの吸光度測定により通過液中のタンパク質の有無を確認しながら、この波長でのタンパク質の吸収がなくなるまでPBS緩衝液を通過させた。次いで100mMクエン酸緩衝液(pH4.0)でカラムに吸着したIgGを溶出し、溶出液に直ちに1MのPBS緩衝液を加えた。

10 【0019】このようにして得られた、カラムの通過液の画分とカラムに吸着した画分をそれぞれSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法(Laemmli 1970)を用いることにより含まれるタンパク質を同定した。その結果、プロテインA固定化ポリエステル繊維カラムに吸着した画分には分子量15万付近にIgGに相当する単一のバンドが確認され、一方通過液画分には他の血漿タンパクが確認されたが、IgGに相当する位置にバンドは検出されなかった。

【0020】実施例3

20 ポリウレタンからなる繊維(5デニール)を蒸留水中に浸漬し、80℃、1時間熱水処理した。全モノマー濃度3mol/l、無水マレイン酸と2-ヒドロキシエチルメタクリレートモノマー組成を1:3としたアセトン溶液に、熱水処理後、蒸留水にて洗浄、乾燥したポリウレタン繊維を浸漬し、⁶⁰Co- γ 線を線量率10kGy/h、窒素雰囲気下、常圧下で、1時間同時照射することによりグラフト重合反応を行った。照射後、繊維を取り出しアセトンでよく洗浄した後、乾燥させた。得られた繊維をプロテインA (SIGMA社製)を含む10mM酢酸(pH4.0)緩衝液中に室温で2時間浸漬することによりプロテインAの固定化を行った。

【0021】このようにして得られたプロテインA固定化ポリウレタン繊維1gをカラム(0.5×15cm)に詰め、0.9%塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH7.2)に0.1%(w/v)アジ化ナトリウムを加えた溶液で平衡化し、その後の反応に用いた。

【0022】ウサギ血液より得られる血清を等量のPBS緩衝液で希釈したものを試料とした。この試料を流速1ml/3minでプロテインA固定化ポリウレタン繊維カラムに通過させ、通過液を分取した。さらに、280nmでの吸光度測定により通過液中のタンパク質の有無を確認しながら、この波長でのタンパク質の吸収がなくなるまでPBS緩衝液を通過させた。次いで100mMクエン酸緩衝液(pH4.0)でカラムに吸着したIgGを溶出し、溶出液に直ちに1MのPBS緩衝液を加えた。

【0023】このようにして得られた、カラムの通過液の画分とカラムに吸着した画分をそれぞれSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法(Laemmli 1970)を用いることにより含まれるタンパク質を同定した。その結果、プロ

50 テインA固定化ポリウレタン繊維カラムに吸着した画分

5

には分子量15万付近にIgGに相当する単一のバンドが確認され、一方通過液画分には他の血漿タンパクが確認されたが、IgGに相当する位置にバンドは検出されなかった。

【0024】比較例1

プロテインA-Sepharose CL-4B (ファルマシア社製)
1. 5gを0.9%塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(pH8.0)に0.1%(w/v)アジ化ナトリウムを加えた溶液で膨潤させた後、カラム(0.5×15cm)に詰め、同液で平衡化した。

【0025】こうして得られたプロテインA-Sepharoseカラムに実施例1と同様にウサギ血清を通過させ、カラムに吸着した画分と通過した画分をそれぞれSDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけることによりIgG

6

の精製を確認した。その結果、カラムに吸着した画分ではIgGに相当する位置のバンドの他に少量の血漿タンパクのバンドが認められ、一方通過液の画分においては血漿タンパクの他に少量ではあるが、IgGに相当するバンドも認められ、カラムへのIgGの選択的吸着が良好でないことが分かった。

【0026】

【発明の効果】本発明のプロテインA固定化吸着体によれば、プロテインAの活性を低下させることなく繊維上に固定されているので、プロテインA特有の抗体(免疫グロブリン)との特異的吸着性を良好に保持しており、抗体を選択的に吸着することにより極めて効率的に分離、精製することができ、経済的に有利である。